

从玉米胚中大量制备植物钙调素*

龚明¹ 杜朝昆¹ 杨中汉² 曹宗巽²

(¹ 云南师范大学生命科学系, 昆明 650092)

(² 北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘要 从每公斤萌发 24 h 的玉米胚丙酮粉中可提纯得 63 mg 的钙调素(CaM),这是目前从每公斤植物材料中所提纯得 CaM 的最高记录。对其理化性质的研究表明,玉米胚 CaM 有较高的生物学活性,能较好地激活磷酸二酯酶,其紫外吸收光谱, SDS-PAGE 电泳行为及氨基酸组成与其它的植物 CaM 相似。上述结果表明玉米胚是 1 个提取植物 CaM 的适宜材料。

关键词 钙调素, 玉米, 胚

MASS PREPARATION OF PLANT CALMODULIN FROM MAIZE GERM

GONG Ming¹, DU Chao-Kun¹, YANG Zhong-Han², CAO Zong-Xun (T.H. Tsao)²

(¹ Department of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092)

(² Life Science College, Peking University, Beijing 100871)

Abstract 63 mg calmodulin was extracted and purified from 1 kg acetone powder of maize germ germinated for 24 h, which is the highest record for the quantity of calmodulin purified from 1 kg plant materials. Our results showed that the calmodulin from maize germ had higher biological activity, could activate cAMP phosphodiesterase within a good range, and its UV absorption spectrum, electrophoretic mobility on SDS-PAGE in the presence or absence of Ca^{2+} and amino acid composition was similar to those calmodulins from other plant materials. The above-mentioned results indicated that maize germ is a suitable material for the extraction and purification of plant calmodulin.

Key words Calmodulin, Maize, Germ

现已知 Ca^{2+} 不仅仅是作为 1 种植物必需的大量营养元素,更重要的是作为 1 个胞内第二信使,作为植物生长发育的主要调控者(龚明等,1990;孙大业等,1993;Gilroy,1990;Bush,1993)。而 Ca^{2+} 的受体蛋白钙调素(Calmodulin,简称 CaM)参与中介许多 Ca^{2+} 调节的生理生化反应(龚明等,1990;孙大业等,1993;Piazza,1988;Marme,1988,1989)。钙调素被认为是在生物中普遍存在的,目前已从多种植物中提取出钙调素,如菠菜,花生,大麦,小麦,燕麦,水稻,豌豆,大豆,白菜,南瓜,藻类,洋葱,柑桔(Piazza,1988;Marme,1988,1989),鳄梨(Roux,1989),油菜(刘宾等,1989),罂粟和续随子(*Euphorbia lathyris*)(Thompson 等,1989),菜豆(Umekawa,1990),云南松花粉(Gong 等,1993)等。

*国家自然科学基金(39360012),云南省科委配套基金和云南省教委科研基金资助项目

1995-01-03 收稿, 1995-04-25 修回

但 CaM 在植物中含量甚微,一般从每公斤植物材料中仅能提得几个毫克的钙调素,其中最高记录是从 1 kg 麦胚中提出 10 mg CaM(Anderson,1983)。而从每公斤动物组织如脑或睾丸中可提得 100~200 mg 的 CaM。所以在研究 CaM 对植物细胞的效应时,常用的是动物来源的 CaM(Gong 等,1994)。但用动物 CaM 和植物 CaM 制备的抗体对植物 CaM 的免疫反应存在差异(李家旭等,1992),表明尽管不同生物的 CaM 有较高的保守性及结构和功能上的类似性,但用动物的 CaM 来研究对植物细胞的生理生化过程的效应不一直都是十分适宜的。所以寻找合适的植物材料来获得大量的植物 CaM 变得十分重要。

本文介绍了用玉米胚可大量制备植物 CaM,并研究了玉米胚 CaM 的部分理化性质及种子萌发过程中胚的 CaM 含量的变化。

材料和方法

实验材料

玉米(*Zea mays*)胚购自北京玉渊潭淀粉厂。玉米种子首先被浸种约 24 h 后,胚与胚乳被机械分离。其中胚乳被用于制取淀粉,而胚作为副产物用来榨取玉米油。

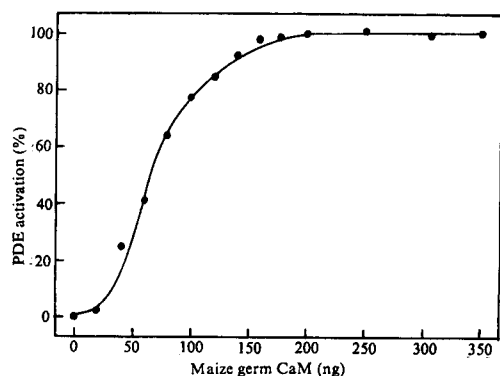


图 1 玉米胚 CaM 对牛心 cAMP 磷酸二酯酶(PDE)的激活曲线。在存在 300 ng 的玉米胚 CaM 时,PDE 的最大激活活性为 $442 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$,被作为 100%;而当反应体系中不存在 CaM 时,PDE 的基础活性为 $38.1 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$,被作为 0%

Fig. 1 Activation of bovine heart cAMP phosphodiesterase (PDE) by maize germ CaM. The maximum activity of PDE in the presence of 300 ng maize germ CaM, $442 \text{ nmol cAMP hydrolysed mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$, was taken as 100%; the basal activity of PDE in the absence of added maize germ CaM, $38.1 \text{ nmol cAMP hydrolysed mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$, was taken as 0%

玉米胚的紫外吸收光谱用 Shimadzu UV-240 型分光光度计测定。

玉米胚的 SDS-PAGE 按 Poucet 和 Trifaro(1988)的方法进行。其中胶中或加入 1 mmol/L CaCl_2 ,或加入 1 mmol/L EGTA 。

实验所用试剂中,牛心磷酸二酯酶(PDE),cAMP, $\text{W}_7[\text{N}-(6\text{-amino-hexyl})-5\text{-chloro-1-naphthalene sulfonamide hydrochloride}]$,PMSF(苯甲磺酰氟),响尾蛇蛇毒等购自 Sigma, Phenyl-sephsrose CL 4B, SephadexG-75 及 SDS-PAGE 分子量标准蛋白购自 Pharmacia, EGTA (ethylene glycol-bis(β -amino ethyl ether)-N,N',N'-tetraacetic acid)为东京化成产品。其余为进口分装或国产分析纯试剂。

玉米胚 CaM 的提取和纯化

由于玉米胚含较多的油脂,故风干的玉米胚被粉碎后,用 5 倍体积的冷丙酮抽提油脂以制成丙酮粉,每公斤玉米胚可制得 746 g 丙酮粉。玉米胚丙酮粉经缓冲液提取,3% TCA(三氯乙酸)沉淀,90℃ 热变性,然后经 Phenyl-Sepharose 4B 柱亲和层析和 Sephadex G-75 柱进一步纯化。详细流程见我们以前的工作(Gong 等,1993; 1994)。经该程序提取的玉米胚 CaM 在 SDS-PAGE 上显示均一的条带。

玉米胚 CaM 的理化性质分析

玉米胚 CaM 对牛心 PDE 的激活反应按叶正华等(1990)的方法。在检验 EGTA 或 W_7 对 CaM 激活的 PDE 的抑制时,反应液中不加 CaCl_2 而加 2 mmol/L EGTA ,或加入 $50 \mu\text{mol/L W}_7$ 。

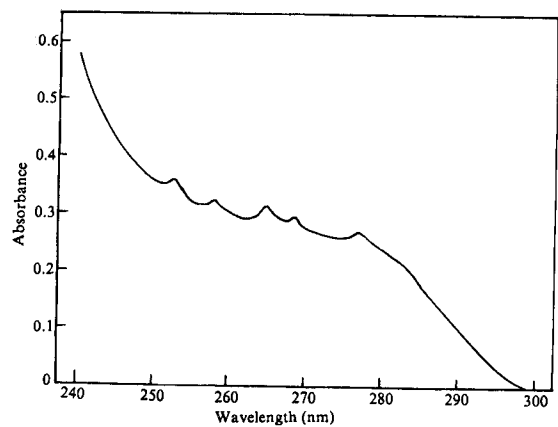


图 2 玉米胚 CaM 的紫外吸收光谱。CaM 浓度为 0.5 mg / mL

Fig.2 UV absorbance spectrum of maize germ CaM. The concentration of CaM was 0.5 mg / mL

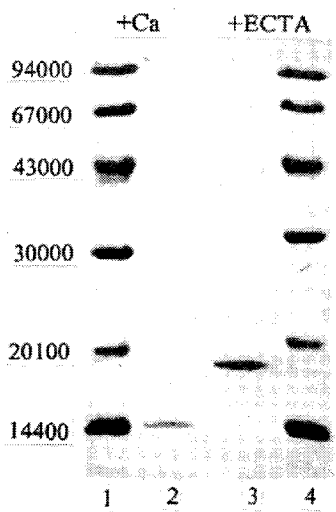


图 3 玉米胚 CaM 的 SDS-PAGE 图谱。胶浓度为 15%，胶中或含 1 mmol / L CaCl₂(1,2), 或含 1 mmol / L EGTA (3, 4)。其中 1 和 4 为分子量标准蛋白(Pharmacia), 分子重如图 3 左边所示

Fig.3 SDS-PAGE of maize germ CaM on a 15% gel. Electrophoresis was performed in the presence of 1 mmol / L CaCl₂(lane 1 and 2) or 1 mmol / L EGTA (lane 3 and 4). Lane 1 and 4 contained molecular weight markers (Pharmacia), and the molecular weight was showed on the left of fig.3

玉米胚 CaM 的氨基酸组分用 Beckman 121-MB 型氨基酸自动分析仪分析。

玉米种子萌发过程中胚的 CaM 含量变化

种子经 0.1% HgCl₂ 消毒后, 播种于下垫湿润滤纸的瓷盘中, 在 27℃ 下暗萌发 36 h。定时取种子手工剥取玉米胚, 用磷酸二酯酶法(叶正华等, 1990)测定 CaM 的含量。蛋白质含量按 Bradford(1976)方法测定。

结果和讨论

1 kg 玉米胚丙酮粉经缓冲液提取, TCA 沉淀, 热变性, Phenyl-Sephadex 4B 及 Sephadex G-75 层析后, 可获得 63mg 纯化的 CaM(层析图谱略), 相当于每公斤玉米胚可制备 47 mg 纯化的 CaM, 这也是到目前为止从 1 kg 植物材料中所能提纯的 CaM 数量的最高记录。表明玉米胚是 1 个提取植物 CaM 的适宜材料。

为了证实该程序所提取的玉米胚 CaM 的生物学活性, 我们检验了它对牛心 cAMP 磷酸二酯酶(PDE)的激活效应。如图 1 所示, 随着反应体系中玉米胚 CaM 加入量的增加, PDE 从其基础活性上被逐渐激活, 达到最大激活量一半所需的 CaM 为 65 ng。当加入的 CaM 为 200~250 ng 时, PDE 可达到最大的激活。最大激活活性为其基础活性的 11.6 倍, 表明玉米胚 CaM 有较好的生物活性。

另一方面,在反应体系中存在 300 ng CaM 时,加入 2 mmol / L Ca^{2+} 专一螯合剂 EGTA,或加入 50 μmol / L CaM 抑制剂 W_7 ,都可使玉米胚 CaM 对 PDE 的激活被完全抑制(表 1),显示玉米胚 CaM 对 PDE 的激活是 Ca^{2+} 依赖的,并被 CaM 抑制剂所抑制。

与文献报道的动物或植物的 CaM 紫外吸收光谱特性相类似,玉米胚 CaM 在 253, 259, 265, 268 和 277 nm 处也有 5 个吸收峰,显示了在无色氨酸的影响下,苯丙氨酸与酪氨酸高比例时(8:2) CaM 所特有的多峰形紫外吸收图谱(图 2)。

表 1 EGTA 和 W_7 对玉米胚 CaM 激活的磷酸二酯酶的效应

Table 1 Effects of EGTA and W_7 on maize germ CaM activation of PDE

Addition of CaM (ng)	PDE activity (nmol mg^{-1} protein min^{-1})
0	38.4 $\pm$ 2.5 (basal activity)
300	443.7 $\pm$ 7.8 (maximum activation)
0 + 2 mmol / L EGTA	36.1 $\pm$ 2.9
300 + 2 mmol / L EGTA	37.2 $\pm$ 3.1
0 + 50 μmol / L W_7	35.9 $\pm$ 2.7
300 + 50 μmol / L W_7	39.8 $\pm$ 2.2

表 2 玉米胚 CaM 的氨基酸组分分析及其与其它植物和动物 CaM 的比较

Table 2 Amino acid composition of maize germ CaM as compared to CaMs from other plant and animal sources

amino acid	Maize germ CaM	P. yunnanensis pollen CaM ¹⁾	Peanut CaM ²⁾	Spinach CaM ³⁾	Bovine Brain CaM ⁴⁾
Asp	25	23	27	24	23
Thr	9	8	9	9	12
Ser	6	7	5	4	4
Glu	26	25	28	27	27
Pro	3	4	2	2	2
Gly	11	12	11	10	11
Ala	11	10	11	11	11
Cys	1	1	1	1	0
Val	7	6	6	8	7
Met	7	6	7	8	9
Ile	6	6	6	7	8
Leu	12	11	11	11	9
Tyr	2	2	1	1	2
Phe	8	8	8	9	8
Lys	8	9	8	9	7
Try	0	0	0	0	0
His	1	2	1~2	1	1
Arg	4	7	4	5	7
Tml	ND	ND	1	1	1
total residues	147	147	148	148	148

Tml: trimethyllysine; ND: not determined.

1): 见文献 Gong 等,1993; 2): 见文献 Anderson 等,1980; 3,4): 见文献 Watterson 等,1980.

CaM 在进行 SDS-PAGE 电泳时,根据电泳介质中是否存在 Ca^{2+} 或 EGTA,其电泳迁移率会发生特征性变化(Gong 等,1994)。玉米胚 CaM 也显示了类似的变化:当聚丙烯酰胺胶中存在 1 mmol / L Ca^{2+} 时,CaM 的表现分子量为 14800,而在缺 Ca^{2+} (+ 1 mmol / L EGTA)时,CaM 的表现分子量为 18500 (图 3)。

对玉米胚 CaM 的氨基酸组分进行分析的结果表明(表 2),其酸性氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸)含量丰富,约占氨基酸残基总数的 1 / 3,远大于碱性氨基酸(组氨酸,赖氨酸和精氨酸)的比例(8.8%),不含色氨酸,其组分总体上与其它植物及动物 CaM 的氨基酸组分相似(表 2)。

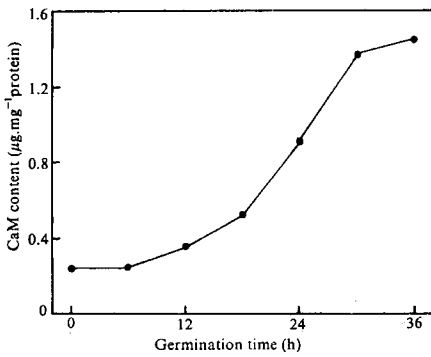


图 4 玉米种子萌发早期胚内 CaM 含量的变化

Fig.4 Change of CaM content in maize germ during early seed germination

为了确定什么时候或什么状态的玉米胚能提取更多数量的 CaM, 我们测定了玉米种子萌发过程中胚内 CaM 含量的变化。结果表明, 玉米种子在萌发过程中, 尤其是在萌发早期, 胚内 CaM 含量迅速增加(图 4)。考虑到玉米胚的机械剥离等因素, 我们认为萌发 24~30 h 的玉米胚是较适宜于大量提取 CaM 的植物材料。

此外, 我们最近的研究发现玉米种子萌发初期胚内的 CaM 结合蛋白的数量和种类发生了明显的变化(Gong 等, 1995), 这与现在发现的种子萌发初期胚内 CaM 含量的显著增加(图 4)互相呼应, 表明种子萌发初期胚内代谢过程的启动与重建受 Ca^{2+} -CaM 的调控。

基于上述的结果, 我们认为经过一段时间萌发的玉米胚是 1 个提取植物 CaM 的适宜的材料。对其理化性质的研究表明, 在本流程中提取的玉米胚 CaM 具有较高的生物学活性, 其紫外吸收光谱, SDS-PAGE 电泳行为及氨基酸组成类似于从其它植物中提取的 CaM, 适用于有关 CaM 对植物细胞的各种生理生化过程影响的研究。

参 考 文 献

- 叶正华, 郭季芳, 孙大业, 1990. 应用磷酸二酯酶定量测定植物钙调素. 植物生理学通讯, 26(1):54
- 刘 滨, 杜锦珠, 1989. 油菜花粉钙调素的分离纯化和性质的研究. 生物化学与生物物理学学报, 21(5):477
- 孙大业, 郭颜林, 1993. 细胞信号系统. 北京: 科学出版社, 140
- 李家旭, 孙大业, 1992. 植物及动物钙调素抗体免疫反应特性的比较研究. 植物学报, 34(4):257
- 龚 明, 李 英, 曹宗巽, 1990. 植物体内的钙信使系统. 植物学通报, 7(3):19
- Anderson J M, Charbonneau H, Jones H P *et al*, 1980. Characterization of the plant nicotinamide adenine dinucleotide kinase activator protein and its identification as calmodulin. *Biochemistry*, 19: 3113
- Anderson J M, 1983. Purification of plant calmodulin. *Methods in Enzymology*, 102: 9
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248
- Bush D S. 1993. Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol*, 103(1):7
- Doucet J P, Trifaro J M, 1988. A discontinuous and highly porous sodium dodecyl sulfate polyacrylamide slab gel system of high resolution. *Anal Biochem*, 168: 265
- Gilroy S, 1990. Calcium as a regulatory system in plants. In: L J Anghileri (ed), *The Role of Calcium in Biological Systems*. Vol. 5, Florida: CRC Press, 67
- Gong M, Yang Z H, Tsao T H, 1993. Isolation and characterization of calmodulin and a novel calcium-binding protein calpollenin from *Pinus yunnanensis* pollen. *Plant Sci*, 89(1):5
- Gong M, Yang Z H, Tsao T H, 1994. Involvement of calmodulin in pollen germination and pollen tube growth. 植物生理学报, 20(3):240
- Gong M, Li Z G, 1995. Isolation and identification of calmodulin-binding proteins from *Zea mays* germs and their pattern changes during early seed germination. *Phytochemistry*, (accepted)

- Marme D, 1988. The role of calmodulin in plants. In: P Cohen and C B Klee (eds), *Calmodulin*. Amsterdam: Elsevier Press, 313
- Marme D. 1989. The role of calcium and calmodulin in signal transduction. In: W F Boss and D J Morre (eds), *Second Messengers in Plant Growth and Development*. NY: Alan R Liss Inc, 57
- Piazza G J, 1988. Calmodulin in plants. In: M P Thompson (ed), *Calcium-binding Proteins*. Vol. I, Florida: CRC Press, 127
- Roux L P F, Dubery I A, 1989. Purification and biochemical characterization of a calmodulin from avocado fruit tissue. *Phytochemistry*, **28**(3):705
- Thompson M P, Piazza G J, Brower D P *et al*, 1989. Purification and characterization of calmodulin from *Papaver somniferum* and *Euphorbia lathyris*. *Plant Physiol*, **89**(3):501
- Umekawa H, Tamiya T, Furuichi Y *et al*, 1990. Purification and characterization of Tora-mame (*Phaseolus vulgaris*) seed calmodulin. *Agric Biol Chem*, **54**(11):2641
- Watterson D M, Iverson D B, Van Eldik L J, 1980. Spinach calmodulin: Isolation, characterization, and comparison with vertebrate calmodulins. *Biochemistry*, **19**: 5762
- Watterson D M, Sharief F, Vanaman T C, 1980. The complete amino acid sequence of the Ca^{2+} -dependent modulator protein (calmodulin) of bovine brain. *J Biol Chem*, **255**: 962